

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008295395

WPI Acc No: 1990-182396/199024

XRAM Acc No: C90-079309

XRPX Acc No: N90-141728

**Method of detecting nucleic acid - by immobilising sample of membrane and hybridising with nucleic acid contg. complementary base sequence**

Patent Assignee: SHIMADZU SEISAKUSHO KK (SHMA )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 2119800	A	19900507	JP 88275928	A	19881031	199024 B
JP 2794728	B2	19980910	JP 88275928	A	19881031	199841

Priority Applications (No Type Date): JP 88275928 A 19881031

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

JP 2119800	A	6			
------------	---	---	--	--	--

JP 2794728	B2	6	C12Q-001/68	Previous Publ. patent	JP 2119800
------------	----	---	-------------	-----------------------	------------

Abstract (Basic): JP 2119800 A

Method comprises immobilizing a sample nucleic acid on a membrane, hybridizing the sample nucleic acid with a nucleic acid contg. a base sequence complementary to the sequence to be detected of the sample nucleic acid, and detecting the sample nucleic acid. The membrane immobilized with the sample nucleic acid is subjected to blocking treatment by immersing the membrane in a soln. contg. 0.01-30 w/v % PVA or/and 0.01-30 w/v % PVP after the immobilization of the sample nucleic acid onto the membrane.

PVA used is pref. that of 500 in the degree of polymerization. Solvent for dissolving PVA and PVP is pref. distilled. water. The blocking treatment is pref. carried out at 30-50 deg.C for 0.25-1 hr. Membrane used is e.g. nitrocellulose film. Nucleic acid in a sample is modified into single-stranded one and immobilised onto nitrocellulose film.

USE/ADVANTAGE - The method is useful for detecting nucleic acid having a given base sequence by utilising hybridization of nucleic acid. By using PVA soln., PVP soln. or PVA-PVP soln. for the blocking treatment of the membrane, non-specific adsorption of labelled probe onto the membrane can be greatly reduced, consequently even weak signals buried in background can be detected and then nucleic acid can be detected with high sensitivity.



(18)日本国特許庁 (JP)

(12) 特許公報 (B2)

(11)特許番号

第2794728号

(45)発行日 平成10年(1998) 8月10日

(24)登録日 平成10年(1998) 6月28日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 12 Q 1/68  
// C 12 N 15/09

識別記号

F I  
C 12 Q 1/68  
C 12 N 15/00

A

請求項の数1(全 6 頁)

(21)出願番号 特願昭63-275928  
(22)出願日 昭和63年(1988)10月31日  
(65)公開番号 特開平2-119800  
(43)公開日 平成2年(1990)5月7日  
審査請求日 平成7年(1995)7月21日

(73)特許権者 99999999  
株式会社島津製作所  
京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地  
(72)発明者 山形 浩一  
京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地  
株式会社島津製作所三条工場内  
(74)代理人 弁理士 西岡 義明 (外2名)  
審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 特開 平2-145199 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>6</sup>, DB名)  
C12Q 1/68

(54)【発明の名称】 検査の検出方法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】検体試料の核酸を膜に固定し、試料核酸の検出しようとする配列順序と実質的に相補的な塩基配列を含む核酸を試料核酸とハイブリダイズさせて、試料核酸の検出を行なう方法において、

試料核酸の膜への固定後、この膜を0.01~30W/V%のPVA又は/及び0.01~30W/V%のPVPを含有する溶液に浸してブロッキング処理することを特徴とする核酸の検出方法。

【発明の詳細な説明】

(イ)産業上の利用分野

本発明は、特定の塩基配列を持つ核酸を検出する方法、詳しくは核酸のハイブリダイゼーションを利用する検出方法に関する。

(ロ)従来技術

2

検体試料中の目的とする特定の塩基配列を持つ核酸を検出する方法として核酸のハイブリダイゼーションが利用されている。この分析法は一本鎖に変性された核酸が適当な条件下で相補的な塩基配列を含む別の一本鎖の核酸と配列に特異な水素結合を介してハイブリッドを形成する(ハイブリダイズする)ことを利用したものである。

すなわち、ハイブリダイゼーションアッセイにおいては、既知の配列を有する核酸をプローブとして用いて、

10 試料のなかにターゲットとなる相補的な配列がないかを調べる。プローブとターゲットによって形成されたハイブリッドに標識を付けることにより、試料中の相補的配列の検出及び定量が可能になる。

ハイブリッドを検出するためにプローブに標識付けをする方法の一つは、プローブに放射性同位元素(例え

ば、<sup>32</sup>Pあるいは<sup>125</sup>I)を結合させることである。

しかし、安全性や安定性、また設備等の問題から非放射性標識システムの開発が進められている。

非放射性標識システムとしては、第一のタイプとして、プローブに直接、共有結合で蛍光あるいは化学発光を生ずる官能基を導入するものである。第二のタイプとしては、抗体やビオチンなどの巨大分子によって認識される部位をプローブに共有結合で導入し、蛍光標識あるいは化学発光標識した巨大分子で認識し、プローブの存在を検出しようとするものである。第三のタイプとしては、第一及び第二のタイプのシステムに酵素による增幅作用を利用したものである。

ハイブリダイゼーションアッセイは、疾患の診断に用いられることが多くそのため迅速、簡便、高感度でしかも放射性同位元素を扱うのに必要な特別の設備が不要であることが求められている。これらのことから最近では、第三のタイプの非放射性標識システムの開発が進められている。

第三のタイプの非放射性システムとしては、例えば、プローブに直接酵素を共有結合で導入したもの (Renz, M., and Kurz, C. (1984) Nucl. A Cids Res. 12, 3435-3444) が知られている。

従来から行われている核酸のハイブリダイゼーションアッセイの概要は以下に示した通りである。

まず、検体試料中の核酸を変性して一本鎖とした後、支持体であるニトロセルロース製の膜に80°Cで2h程度焼付け、固定する。

次に、標識プローブの非特異吸着を抑えるためにプレハイブリダイゼーションバッファー（例えば、EDTA、塩化ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、ポリエチレンジルコール、フィコール、ポリビニルピロリドン、牛血清アルブミン、サケ精子DNA及びホルムアミドを含むトリス塩酸緩衝液）中でプレハイブリダイゼーションを行う。プレハイブリダイゼーションは通常37°Cで30min程度行うことが多い。

プレハイブリダイゼーションの後、試料の核酸を固定した膜を標識プローブを含むハイブリダイゼーションバッファー（プレハイブリダイゼーションバッファーと組成は同じ）中で数hから一晩インキュベートする。

次いで膜に固定されている試料の核酸にハイブリダイズしていない標識プローブを除去するためにドデシル硫酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、塩化ナトリウムを含むトリス塩酸緩衝液等で洗浄する。

洗浄の終わった膜を酵素反応によって沈着性色素、可溶性色素、蛍光性物質、発光性物質等を生成する酵素反応基質を含む緩衝液中でインキュベートすると検体試料中に標識プローブと相補的な配列を持つ核酸が含まれる場合にのみ膜が着色、あるいは蛍光、あるいは発光が観

測される、このことにより検体試料の核酸中の特定塩基配列を検出する。

#### (ハ) 発明が解決しようとする課題

しかし、現在十分な感度でしかも迅速、簡便、定量的にターゲットの核酸を検出する非放射性標識システムは確立していない。

この原因は、ハイブリダイゼーションアッセイを行う過程で酵素等の巨大分子で標識したプローブがターゲット以外のもの、特に試料の核酸の固定に用いるニトロセルロース膜に非特異吸着し、バックグラウンドが上昇するからである。現在、広く用いられているDenhardt's 液液やスキムミルク溶液 (Johnson, D. A. Gauth, J. W., Sportsman, J. R. and Elder, J. H. (1984), Gene Analytical technology 1, 3-8) では、十分にアーロブの非特異吸着を抑えることができず、高感度にターゲットの核酸を検出することができない。

本発明は、以上のような状況を鑑みなされたものである。すなわち、標識プローブのターゲット以外への非特異吸着を抑える方法を開発することによって、迅速、簡便、かつ高感度にターゲットの核酸を検出するシステムを供することである。

#### (二) 課題を解決するための手段

本発明は、上記の課題を解決する手段としてハイブリダイゼーションアッセイにおいて試料の核酸を固定した後にこの膜を0.01~30W/V%PVA及び0.01~30W/V%のPVPを含有する溶液（以下PVA-PVP溶液と略する。）、あるいは0.01~30W/V%のPVAを含有する溶液（以下PVA溶液と略する）、あるいは0.01~30W/V%のPVPを含有する溶液（以下PVP溶液と略する）に浸してブロッキング30処理を行う過程を含む核酸の検出法を供するものである。

本発明においては、用いるPVAは重合度が500のものが好ましいがこれに限定されるものではない。また、PVA及びPVPを溶解する溶媒は蒸留水が好ましいがこれに限定されるものではない。また、本発明におけるブロッキング処理の条件は、処理温度は30~50°C、処理時間は0.25~1hが好ましいがこれに限定されるものではない。

#### (ホ) 実施例

以下、実施例に基づき、本発明を具体的に説明する。

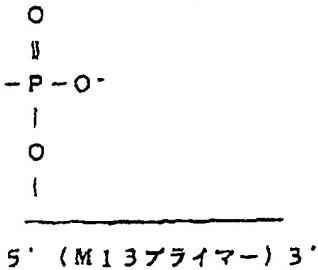
但し本発明は、実施例に限定されるものではない。

アンペロメトリック検出器によるM13mp8一本鎖ファージDNAの検出

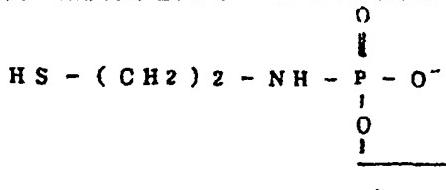
(1) M13プライマー (5' -GTAACCGACGGCCAGT -3') のALP標識は、多田ら、特願昭63-191087号に記載されている方法に従った。すなわち、M13プライマーの5'位ヘリン酸残基を導入し、さらにシスタミンと反応させ、リン酸残基にシスタミン残基を導入し、

5

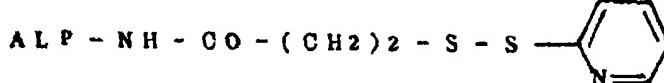
6



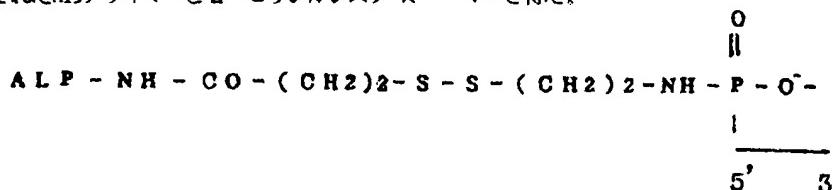
さらにジチオスレイトールを用いて還元し末端がチオーキド基に変換されたM13プライマーを得た。



また、ALPと25倍相当量のSPDPとを反応させ、ALPに2-ビリジルジスルフィド基を導入した。



(2) これらの工程によって得られた「末端がチオーキド基を導入したALPを反応させ、ALP標識したM13プライマーを得た。



(3) M13mp8一本鎖ファージDNAとALP標識M13プライマーとのハイブリダイゼーション(ブロッキング処理の効果)

M13mp8一本鎖ファージDNA(約7000bp)をTE緩衝液(pH7.5, 10mMTris·Cl, 1mMEDTA)で段階希釈し、一辺5mmの正方形に切ったニトロセルロース膜に1μlずつ0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0pmolのM13mp8一本鎖ファージDNAをドットした。風乾後、オーブンで180°C, 2h熱しDNAを固定した。これらの膜を、①、ブロッキング処理しないもの②、PVPを5%含む溶液で処理するもの③、PVAを1W/V%含む溶液で処理するもの④、PVAを1W/V%含み、PVPを5W/V%含む溶液で処理するものに分け96穴プレートに固定しそれぞれの溶液を170μl加えマイクロプレートミキサー上で40°C, 30min振とうした。その後これらの溶液を捨てリン酸緩衝生理食塩水を各穴に170μlずつ加えマイクロプレートミキサー上で1min振とうし、膜を洗浄した。さらにこの洗浄操作を1回繰り返した。

次に各穴にブレハイブリダイゼーション溶液(4×SE T, 0.04W/V%BSA, 0.04W/V%PVP, 0.04W/V%フィコール, 6V/V%ポリエチレンギリコール, 0.1W/V%SDS)を170μl加え、15min振とうした。

☆ずつ加え、マイクロプレートミキサー上で40°C, 15min振とうした。

ブレハイブリダイゼーション溶液を捨てた後(1)で調製したALP標識プローブを0.6pmol/ml含むハイブリダイゼーション溶液(その他の組成はブレハイブリダイゼーション溶液と同じ。)を170μlずつ加えマイクロプレートミキサー上で40°C, 30min振とうしハイブリダイゼーションを行った。

その後、1×SSC, 0.2%SDS溶液170μlずつを用いてマイクロプレートミキサー上で室温1minを2回、40°C, 5minを1回、室温、1minを2回振とうしながら膜を洗浄した。次に氷冷した1×SSC溶液170μlずつを用いてマイクロプレートミキサー上で1min, 2回振とうしながら膜を洗浄した。続いて氷冷した1.5mMの過塩素酸マグネシウムを含むCB緩衝液170μlずつを用いてマイクロプレートミキサー上で1min, 2回振とうしながら膜を洗浄した。

膜をそれぞれ1.5mlのサンプリングチューブに移し替え、1mMのフェニルfosフェイト及び1.5mMの過塩素酸マグネシウムを含むCB緩衝液を100μlずつ加え、37°C, 1hインキュベートした。

その後、直ちに氷冷し、それぞれに0.15Mリン酸5μl, 0.2MEDTA-2Na水溶液20μlを加え酵素反応を停止させた。

酵素反応によって生成したフェノールを検出するため各反応液から10μlずつ第1図に示したアンペロメトリック検出器を組み込んだ高速液体クロマトグラフシステムのオートインジェクターからインジェクトした。分析条件は、カラム: SHIM-PACK ODS内径4.6mm長さ50mm、カラム温度: 40°C、移動相: 0.1Mカリウム-リン酸緩衝液(pH6.8) : メタノール=4:1、流速: 1.0ml/min、検出電位: 0.80VVS. Ag/AgCl、検出温度: 40°Cである。1mMフェニルfosfate及び1.5mM過塩素酸マグネシウムを含むCB緩衝液100μlを37°C, 1hインキュベートし、0.15Mリン酸5μl, 0.2MEDTA-2Na水溶液20μlを加えたもの10μlをインジェクトして得られたクロマトグラムをベースラインとして3min付近に現れるピークのピーク電流値を読み取った。ここでS/Nを5fmol DNAを固定したものから得られたピーク電流値と0mol DNAで得られたピーク電流値の比とすると第2図に示したようにプロッキング処理をしないものではS/N=3.2であるがPVP溶液を用いてプロッキング処理するとS/N=14まで向上し、PVA溶液を用いてプロッキング処理するとS/N=16まで向上した。さらにPVA-PVP溶液を用いることによってS/N=29まで向上した。

すなわち、本発明によるPVP溶液、PVA溶液、PVA-PVP溶液を用いることによってそれぞれ核酸のハイブリダイゼーションにおける標識プローブの非特異吸着を従来の23.20.11%にまで減少させることができた。

(4) M13mp8一本鎖ファージDNAとALP標識M13プライマーとのハイブリダイゼーション(PVA-PVP溶液を用いた高感度検出)

M13mp8一本鎖ファージDNA(約7000bp)をTE緩衝液(pH7.5, 10mM Tris·Cl, 1mM EDTA)で段階希釈し、一辺5mmの正方形に切ったニトロセルロース膜に1μlずつ0.05, 0.5, 5, 50, 500, 5000attomolのM13mp8一本鎖ファージDNAをドットした。風乾後、オープンで180°C, 2h熱しDNAを固定した。この膜を96穴プレートに固定し、各穴にPVAを1W/V%含みPVPを5W/V%含む溶液を170μl加えマイクロプレートミキサー上で40°C, 30min振とうした。その後、このPVA-PVP溶液を捨てリン酸緩衝生理食塩水を穴に170μlずつ加えマイクロプレートミキサー上で1min振とうし、膜を洗浄した。さらにこの洗浄操作を1回繰り返した。

次に各穴にプレハイブリダイゼーション溶液(4×SE T, 0.04W/V%BSA, 0.04W/V%PVP, 0.04W/V%フィコール, 6W/V%ポリエチレングリコール, 0.1W/V%SDS)を170μlずつ加え、マイクロプレートミキサー上で40°C, 15min振

とうした。

プレハイブリダイゼーション溶液を捨てた後(1)で調製したALP標識プローブを0.6fmol含むハイブリダイゼーション溶液(その他の組成はプレハイブリダイゼーション溶液と同じ。)を170μlずつ加えマイクロプレートミキサー上で40°C, 30min振とうしハイブリダイゼーションを行った。

その後、1×SSC, 0.2%SDS溶液170μlずつを用いてマイクロプレートミキサー上で室温, 1minを2回、40°C, 5minを1回、室温, 1minを2回振とうしながら膜を洗浄した。次に氷冷した1×SSC溶液170μlずつを用いてマイクロプレートミキサー上で1min, 2回振とうしながら膜を洗浄した。続いて氷冷した1.5mMの過塩素酸マグネシウムを含むCB緩衝液170μlずつを用いてマイクロプレートミキサー上で1min, 2回振とうしながら膜を洗浄した。

膜をそれぞれ1.5mlのサンプリングチューブに移し替え、1mMのフェニルfosfate及び1.5mMの過塩素酸マグネシウムを含むCB緩衝液を100μlずつ加え、37°C, 1hインキュベートした。

その後、直ちに氷冷し、それぞれに0.15Mリン酸5μl, 0.2MEDTA-2Na水溶液20μlを加え酵素反応を停止させた。

酵素反応によって生成したフェノールを検出するため各反応液から10μlずつ第1図に示したアンペロメトリック検出器を組み込んだ高速液体クロマトグラフシステムのオートインジェクターからインジェクトした。分析条件は、カラム: SHIM-PACK ODS内径4.6mm長さ50mm、カラム温度: 40°C、移動相: 0.1Mカリウム-リン酸緩衝液(pH6.8) メタノール=4:1、流速: 1.0ml/min、検出電位: 0.80VVS. Ag/AgCl、検出温度: 40°Cである。DNA量が0att-omoのものから得られたクロマトグラムをベースラインとして3min付近に現れるピークのピーク電流値を読み取り、グラフにプロットすると第3図のようになつた。すなわち、このシステムを用いることによって50attomo1までのM13mp8一本鎖DNAを検出できた。

#### (ヘ) 効果

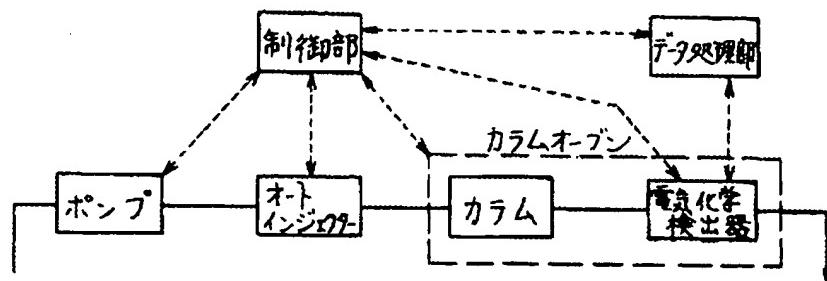
PVA溶液、PVP溶液、PVA-PVP溶液をプロッキング処理することによって標識プローブの膜への非特異吸着を大幅に減らすことができる。それゆえ、今までではバックグラウンドの中に埋もれていた弱いシグナルも検出することができ、高感度に核酸を検出することできる。

#### 【図面の簡単な説明】

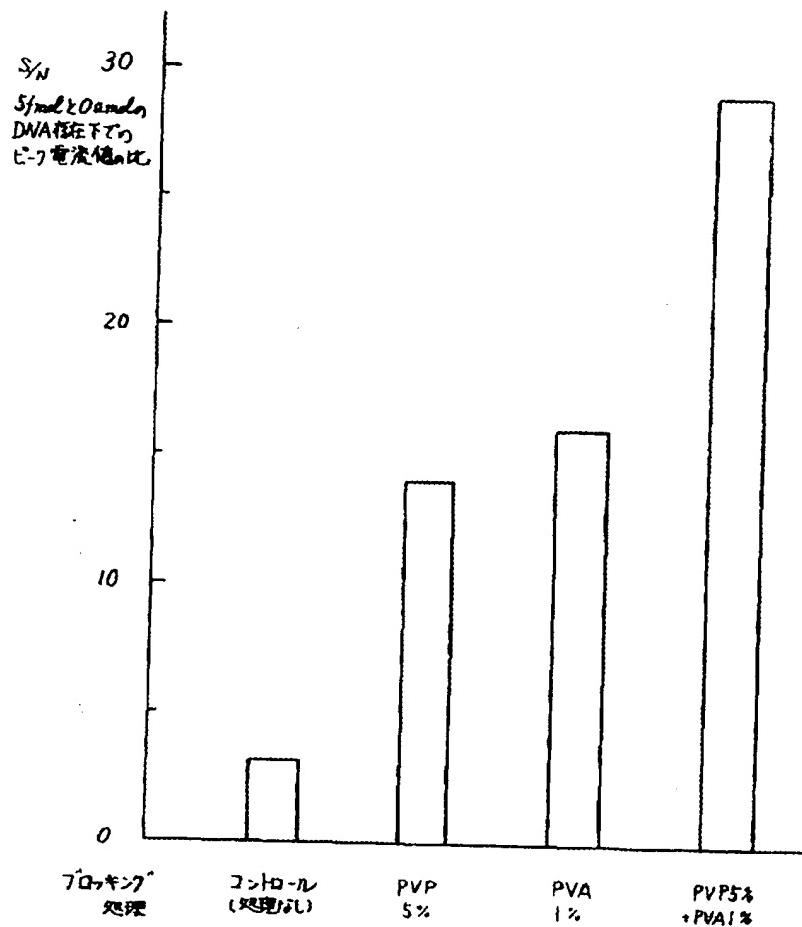
第1図は、酵素反応によって生成したフェノールを検出するための高速液体クロマトグラフシステムを示す図。

第2図は、本発明に係るプロッキング処理の効果を示す図、第3図は、本発明による処理を施してM13mp8 SS DNAの検出特性図である。

【第1図】



【第2図】

各ブロッキング処理の効果

【第3図】

